



Study on the regulatory mechanism of biosynthesis and the function of coccolith polysaccharides in a coccolithophorid, *Emiliana huxleyi* (haptophyceae)

著者	茅野 啓介
内容記述	Thesis (Ph. D. in Science)--University of Tsukuba, (B), no. 2468, 2009.12.31 Includes bibliographical references (leaves 37-44)
発行年	2009
URL	http://hdl.handle.net/2241/106273

氏 名 (本籍)	茅 ^{かや} 野 ^の 啓 ^{けい} 介 ^{すけ} (千葉県)		
学 位 の 種 類	博 士 (理 学)		
学 位 記 番 号	博 乙 第 2468 号		
学位授与年月日	平成 21 年 12 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科		
学 位 論 文 題 目	Study on the Regulatory Mechanism of Biosynthesis and the Function of Coccolith Polysaccharides in a Coccolithophorid, <i>Emiliana huxleyi</i> (Haptophyceae) (円石藻 <i>Emiliana huxleyi</i> におけるココリス多糖の生合成および機能に関する研究)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	白 岩 善 博
副 査	筑波大学教授	理学博士	井 上 勲
副 査	筑波大学准教授	博士 (農学)	鈴 木 石 根
副 査	筑波大学准教授	Ph.D.	遠 藤 一 佳

論 文 の 内 容 の 要 旨

ハプト植物門円石藻 *Emiliana huxleyi* は、 CaCO_3 と酸性多糖より成るココリスと呼ばれる石灰化殻を形成し細胞表面に保持する。その酸性多糖はココリス多糖 (CP) と呼ばれ、マンノースより構成される主鎖とガラクトuron酸、ラムノースおよびキシロース、硫酸基が結合した複雑な側鎖構造を有する。CP はココリス形成に重要な役割を果たすと考えられ、その CP が方解石型の CaCO_3 結晶成長を制御することを示唆する様々な知見が報告されてきた。しかしながら、それらの研究の殆どは、溶液中での CaCO_3 結晶形成に連動した pH 変化をモニターする間接的な機能測定方法を用いたものであり、生体内での結晶形成制御直接的に示す知見としては不十分であった。

本研究は、CP の生体内での役割を明らかにすることを目的とし、以下の実験を行った。すなわち、(1) CP 生合成の制御について生理学的な研究を行い、CP 合成、 CaCO_3 形成およびココリス形成がいかに密接に関連するかを明らかにする、および (2) *E. huxleyi* からの単離 CP が CaCO_3 結晶形成にどのような影響を与えるかについて、ココリス小胞を模した *in vitro* での CaCO_3 結晶成長実験と形成された結晶の顕微鏡観察を行うことにより解析し、CP の *in vivo* における機能について推定することである。

E. huxleyi のココリス形成は、培地中の栄養欠乏 (リン酸、硝酸) や低温などの要因により促進されることが既に報告されていたが、その際 CP 合成がどのような影響を受けるかは未解明であった。また、最近、ココリス形成を誘導する主要因はリン酸欠乏であり、低温はその促進要因であることが報告された。そこで、申請者は、まず、リン酸欠乏条件に着目し研究を行った。

リン酸添加 / 非添加培養条件における細胞およびココリスの CP 蓄積量の変化とココリス形成 (CaCO_3 形成) との関連について解析した。CP (多糖) 合成の基質として $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ を、 CaCO_3 を主成分とするココリス形成の基質として $^{45}\text{CaCl}_2$ を与え、光合成条件下でそれぞれの反応を個別にモニターし、相互の関連を解析した。

^{14}C を用いたラジオトレーサー実験において、多糖合成をCP（酸性多糖）および貯蔵多糖（中性多糖）の合成の2種類に区別して解析したところ、それぞれが培地中のリン酸（Pi）濃度変化により相反する様式で制御されることを見出した。すなわち、CP合成および CaCO_3 形成はPi欠乏条件で促進され、Pi添加条件で抑制された。一方、貯蔵多糖の合成はPi欠乏で抑制され、Pi添加で促進された。

これらの結果は、CP生合成がココリス形成と密接に関連し、連動した反応であることを示すものである。CPはココリス小胞に、貯蔵多糖は細胞質に局在することが知られており、CPの炭素骨格はマンノース鎖であり、貯蔵多糖のそれはグルコース鎖である。したがって、リン酸による代謝上の制御ポイントは、光合成 CO_2 固定反応代謝系を起点する多糖合成系の比較的早い段階に存在すると推定した。CPおよび貯蔵多糖の生合成経路がPiにより明瞭に切り替えられることは、リン酸化に伴うエネルギー供給関連遺伝子の発現や酵素活性が、これらの代謝系の調節に含まれることを示唆するものである。

細胞内のココリス形成は、ココリス形成小胞内において、不溶性の有機基盤上で行われることが電子顕微鏡観察により示されている。そこで、ココリス小胞内の環境を模倣し、アガロースゲルを結晶成長基盤として代替した *in vitro* での CaCO_3 結晶成長のモデル実験系を構築し、実験を行った。*E. huxleyi*の単離CPを用い、プラスチックプレートに固定したアガロースゲルを基盤として、飽和 CaCO_3 溶液中で結晶成長実験を行ったところ、溶液に添加したCPは、c軸が伸張した結晶形成を促進するとともに、アガロースゲル内部への結晶成長を促進させた。一方、ゲル内部に予め添加されたCPは、 CaCO_3 結晶成長を阻害した。これらの結果は、CPは生体内のココリス形成部位においても、 CaCO_3 結晶成長を制御し、結晶成長基盤内部への結晶成長を促進する可能性を示唆するものである。

本研究は円石藻 *Emiliania huxleyi* のCPがココリス形成に深く関与することを、細胞レベルの生理学的実験と化学的な化粧成長実験から証明したものである。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は円石藻 *Emiliania huxleyi* のCPがココリス形成に深く関与することを生理学的な側面から明らかにし、そのCP合成が、Piにより調節されるCP合成遺伝子発現により制御される可能性を示した。また、CPがココリス形成部位において、飽和 CaCO_3 溶液中での結晶成長を抑制し、結晶成長基盤、いわゆる base plate 内部への結晶成長を促進する役割を有することを示唆した。これらの知見は、円石藻の CaCO_3 結晶形成の仕組みを解明した基礎生物学的成果による貢献に加え、CPがゲル状のマトリックス内部への結晶成長を引き起こす仕組みの利用から派生する結晶化学や材料科学への応用に対しても有用な情報を提供するものである。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。